

茉莉酸甲酯诱导下红豆杉细胞产生紫杉烷类 物质群代谢轮廓分析

赵春芳, 余龙江, 刘智, 栗茂腾, 周蓬蓬, 李丽琴

(华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: 红豆杉细胞培养物经甲醇提取和固相萃取粗分离, 进行反相高效液相色谱分析, 获得了约含 13 个与紫杉醇极性相关的化合物色谱图, 通过质谱联用和对照品参照, 归属了这些化合物组成。进一步利用茉莉酸甲酯 (MJ) 诱导细胞, 比较这些组分在诱导前后的相对色谱峰面积变化, 结果表明, 所有紫杉烷组分的浓度在诱导后都提高, 其中以 taxchinin M 及其结构类似物提高最显著, 紫杉醇, B-III 和 B-VI 等比 C14 位取代的 taxuyunnanin C 及其衍生物的浓度增加幅度要大, 提示 MJ 对紫杉醇合成中非有效乙酰化旁路代谢有促进作用, 而对 C14 位取代物生成的旁路促进作用不明显。本文为紫杉醇的生物合成研究提供了新的思路和方法。

关键词: 紫杉烷; 代谢轮廓分析; 红豆杉细胞培养物; 茉莉酸甲酯诱导

中图分类号: Q 946

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2005) 05-0557-08

Metabolic Profiling Analysis of Taxanes in *Taxus chinensis* Cell Cultures Elicited by Methyl Jasmonate

ZHAO Chun-Fang, YU Long-Jiang^{**}, LIU Zhi, LI Mao-Teng,
ZHOU Peng-Peng, LI Li-Qin

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: *Taxus chinensis* cell cultures were extracted with methanol and then prepared by solid-phase extract prior to HPLC or LC-MS analysis. About 13 taxane compounds were identified or characterized by comparisons with LC-MS and standard referents. The profiling analysis of the taxanes by methyl jasmonate (MJ) elicitation indicated that the relative chromatographic peak areas of all these identified compounds were increased but the increasing rates differed. Taxchinin M and its structural analogue had the highest increment. The increasing rates of taxol, B-III and B-VI were more than that of taxuyunnanin C and its derivatives, which were oxygenated at C-14. The results suggested that biosynthesis of taxol and its precursors were more sensitive than oxygenated taxanes at C-14 in response to methyl jasmonate elicitations, while MJ may also elicit the formation of non-effective acetylated taxanes which bear acetate groups at C1,

基金项目: 863 国家重点项目 (102-12-06-01); 2000 年教育部高校骨干教师基金

通讯联系人 Corresponding author. E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn

收稿日期: 2005-01-07, 2005-05-23 接受发表

作者简介: 赵春芳 (1964-) 女, 华中科技大学博士生, 主要研究方向为天然产物化学及生物合成与转化。

C2, C7, C9 and C13. The study may be interesting in metabolic profiling analysis for elucidating taxane biosynthesis.

Key words: Taxanes; Metabolic profiling analysis; *Taxus chinensis* cell cultures; MJ inducement

紫杉烷是红豆杉属植物特有的二萜类化合物, 包括抗癌药物紫杉醇、以及它的半合成前体——10 - 去乙酰巴卡亭Ⅲ (10-DAB) 和巴卡亭Ⅲ (B -Ⅲ) 等。由于红豆杉植物组织中的紫杉醇及其前体含量普遍较低且变化范围大, 且紫杉醇分子中母核部分化学全合成十分困难 (Nicolaou 等, 1994), 因此, 对紫杉醇生物合成机理及其应用的探究多年来一直是植物生物工程领域的研究热点之一 (Baloglu and Kingston, 1999; Eisenreich 等, 1996; Ketchum 等, 1999; Yu 等, 2001)。目前, 已克隆、分离和鉴定了紫杉醇生物合成中十多个关键酶的基因 (余龙江和赵春芳, 2003; Chau 等, 2004), 通过基因工程的手段对紫杉醇生物合成的代谢网络进行调控, 是从源头上解决紫杉醇药源的根本出路 (Morant 等, 2003; Brincat 等, 2002; Jennewein and Croteau, 2001)。

次生代谢物是细胞调控的终产物, 它们的水平可看作是生物系统基因变化和环境变化的最终应答 (Fiehn, 2002; Weckwerth and Fiehn, 2002), 代谢轮廓分析是连接代谢组学和功能基因组学的纽带 (Fiehn 等, 2000), 无论是在细胞、植株层面上对紫杉烷生物合成实施诱导, 还是在分子水平上操纵基因, 都需要知道代谢产物的应答表现。液质联用技术为快速有效的跟踪一组小分子物质的动态消长提供了技术平台, 茉莉酸甲酯 (MJ) 是迄今为止发现的对紫杉醇生物合成最具有诱导活力的一类小分子化合物 (Yukimune 等, 1996), 本文以早年已建立的红豆杉细胞株为材料, 研究一组紫杉烷类物质在 MJ 诱导时的代谢轮廓, 不仅有助于进一步了解红豆杉细胞对 MJ 作用的化学应答, 而且有助于深入认识代谢网络和调控机制, 为生物技术提高活性紫杉烷或有潜在应用价值的目的物产量提供新的思路。

1 实验部分

1.1 仪器与分析条件

细胞代谢产物的动态分析用 Waters HPLC 系统 (510 pump、486 紫外检测器, 美国 Waters 公司) 和 N2000 色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所)。

色谱组分的归属通过对照品比较和液质联用方法, 包括含四极离子阱质量分析器的美国 Finnigan LCQ DUO 质谱, 配有电喷雾源 (ESI) 和 Xcalibur 1.2 数据处理系统; Agilent 1100 系列液相色谱系统。

色谱柱 C18 250 mm×4.60 mm, 5 μ m 粒径, 加 C18 的保护柱; 紫外检测波长 227 nm。

等梯度洗脱方式, 采用乙腈:甲醇:水 (32:20:48) 三元流动相, 流速为 1 ml min。进样量为 10 μ l。

1.2 试剂与参照品

已知成分的混合参照品溶液: 包含 baccatin Ⅲ (B -Ⅲ)、taxol (紫杉醇)、baccatin Ⅵ (B -Ⅵ)、1-acetyl-5, 7, 10-deacetyl-baccatin Ⅰ (DAB -Ⅰ) 和 taxuyunnanin C (Tc), 其中 B -Ⅲ和 taxol 由美国国家肿瘤研究所 (NCI) 赠送; Tc 系本实验室按文献 (Eisenreich 等, 1996) 的描述从中国红豆杉细胞培养物中分离纯化, DAB -Ⅰ和 B -Ⅵ由本实验室早年从红豆杉枝叶浸膏中提取分离并经 NMR 证实了其结构 (余龙江和兰文智, 2002); 各成分的质谱数据见赵春芳和余龙江 (2005); 95% MJ 乙醇溶液购于 Sigma 公司。

甲醇、乙腈色谱纯 (德国 Merck 公司进口原装); C18 固相萃取 (SPE) 小柱 500 mg 3.5 ml (江苏汉邦科技有限公司); 硅胶 GF254 (青岛海洋化工有限公司), 其它有机试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞株和培养条件

细胞株为本实验室从中国红豆杉种子出发建立并经过了 4 年继代培养的细胞系 H21 (Zhang 等, 2000), 培养基配方如下: KNO_3 1011 mg L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 170 mg L, CaCl_2 332.2 mg L; 微量元素、有机成分按 MS 培养基相应成分组方; Fe^{2+} 按 1/2 MS 浓度, 蔗糖 30% (W/V), 激素为 2, 4-D 0.25 mg L, 水解乳蛋白 0.25 mg L, 定容后调至 pH 5.8。

采用 50 ml 三角瓶进行继代培养, 培养基加入量为 20 ml, 取培养至对数生长期的 2 L 三角烧瓶悬浮细胞, 无菌抽滤后接种密度为 12% (每个含 20 ml 培养基的三角瓶中加入 2.4 g 鲜细胞) 将鲜细胞接入 50 ml 摇瓶中, 然后将摇瓶置于 24℃ 的温室内的摇床上, 以 140 r/min 的转速进行振荡培养。第 7 天向培养基中加入 MJ, 使其浓度达到 100 μmol L, 以不加 MJ 的细胞培养物为对照组 (CK)。继续培养 22 d, 按下述步骤制备分析样品。

1.4 分析样品的制备

提取细胞中紫杉烷的总原则是: 以极性较大的 10-DAB 和极性较小紫杉醇为指标成分, 通过提取和粗分离, 使极性相关的紫杉烷类物质尽可能多的进入待测溶液。具体做法如下: 一定质量的鲜冻干细胞加入液氮研碎成很细的粉末, 用甲醇浸泡, 在超声波清洗仪上超声 15 min, 过滤除去固体残渣, 甲醇提取液用 CH_2Cl_2 萃取 3 次以上, 与下面所述培养液的 CH_2Cl_2 萃取液合并。培养液用 CH_2Cl_2 萃取 3 次, 合并萃取液减压蒸馏, 蒸干溶剂后, 残余物用分析纯甲醇溶解、定容至 1 ml。粗样的甲醇提取液用 SPE 的方法进一步去除非极性和强极性的组分, 用 4:1 (V/V) 甲醇:水作为洗脱液, 再经过旋转蒸发, 残余物用小体积的流动相溶解, 过 0.45 尼龙滤膜, 即可作为紫杉烷组 HPLC 分析用样品。

1.5 紫杉烷类物质群的鉴定与相对含量变化分析

HPLC 特征谱中紫杉烷成分通过比较参照品的保留时间辨认, 部分结合 LC-ESI-MS 方法。相对含量以 10 μg ml 紫杉醇标准品峰面积响应值 75001 为参照、样品中各组分峰面积的比值表示; MJ 诱导后与之前的相对峰面积比值用以比较变化幅度。

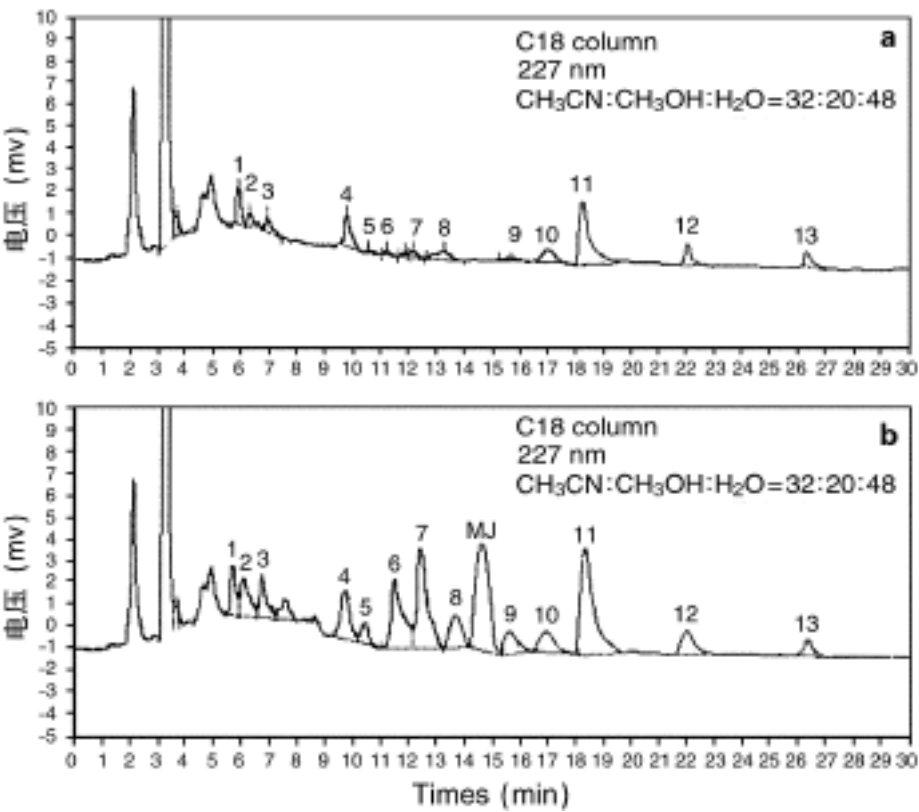


图 1 茉莉酸甲酯诱导前后中国红豆杉细胞萃取物中紫杉烷的 HPLC 谱图

Fig. 1 Effect of elicitation with MJ on taxane metabolic profiling of extracts from *Taxus chinensis*. a. before elicitation; b. after elicitation

2 结果

2.1 细胞萃取物的 HPLC 图谱解析

MJ 加入前后细胞样品的 HPLC 图谱见图 1。由图可知, 诱导前后样品在 3.8~30.0 min 色谱保留区间内共有 13 个共有色谱峰, 这 13 个组分经标准品对照结合 LC-ESI-MS MS 方法确定了组成 (赵春芳和余龙江, 2005), 结构简图见图 2 所示。诱导后多了保留时间为 14.465 min 的大峰, 后经纯 MJ 试剂进行 HPLC 实验, 证实此为 MJ 的峰。10-DAB 紫杉烷图谱中, 一般是保留时间最小的组分, 由于细胞样品中成分很复杂, 用 SPE 的方法通常很难去除所有的干扰物, 本实验 HPLC 谱图中, 该成分的保留

位置处有明显的峰重叠现象, 所以无法明确判断是否含有此物质。我们利用 LC-ESI-MS MS 推测的紫杉烷的种类与 Menhard 等 (1998) 用 NMR 方法报道的结果比较相似, 特别是 Tc 及其衍生物等 C14 位取代紫杉烷主成分, 但低含量的紫杉烷成分与我们的结果略有不同。例如, 本实验获得的组分 2、4~7 在它们的报道中并未出现, 而由他们首次分离发现的 9-dihydro-13-dehydroxybaccatin III、1 α , 4 α , 7 β , 9 α , 10 β -pentaacetoxytax-11-ene 和 13-deacetoxybaccatin I 在本实验 ESI-MS 中也没有获得它们所对应的分子量信息。可能的解释是: (1) 细胞系不同, 紫杉烷产生和代谢性质也就不同; (2) 紫杉烷浓度是动态变化的, 一定程度上反映了紫杉烷代谢途径的中间体的动态平衡, MJ 的加入打破了这种动态平衡, 代谢向着对此化合物“敏感”的反应节点流动。

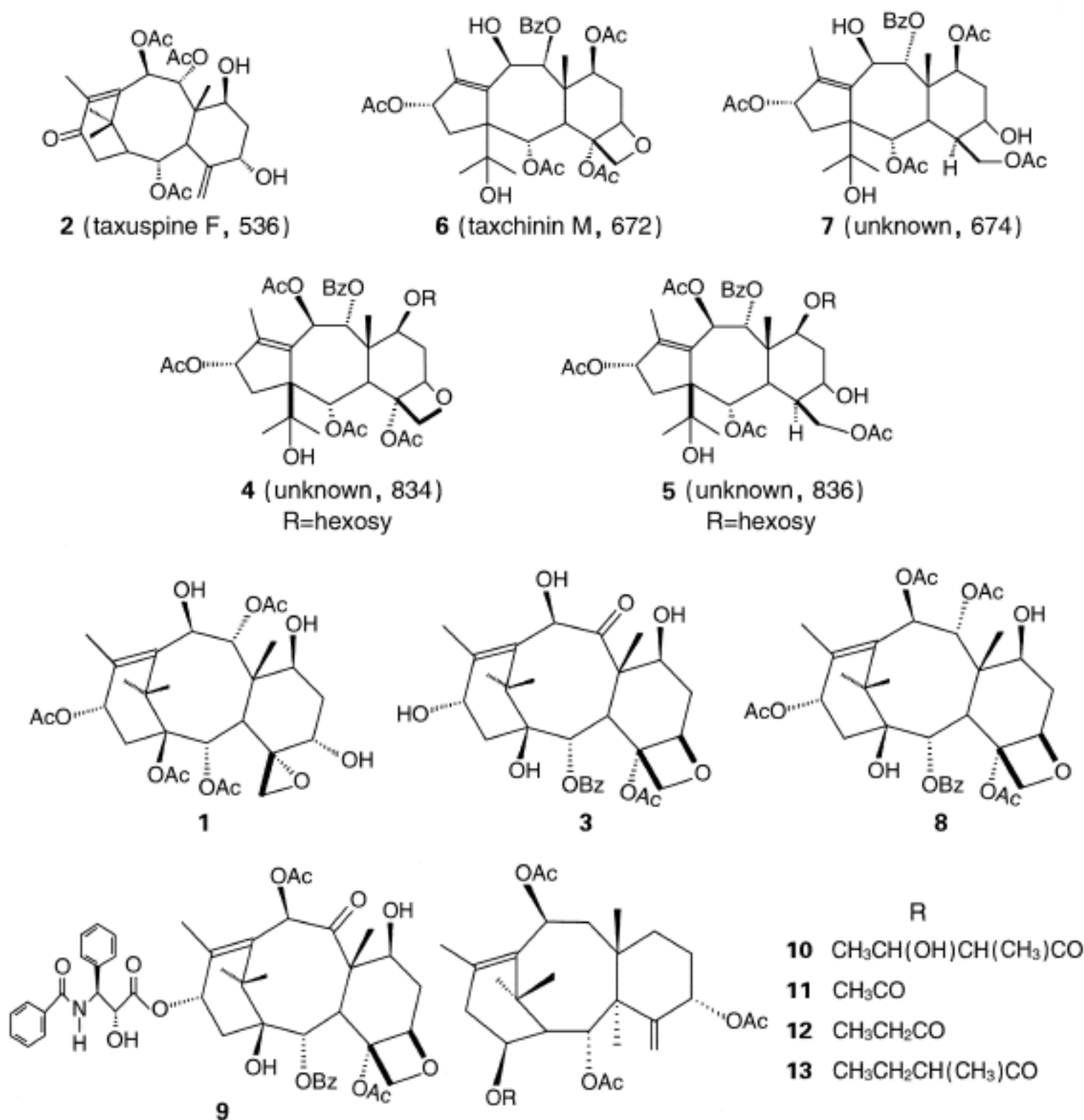


图 2 组分 1~13 化学结构简图

Fig. 2 Chemical structures of taxanes 1 - 13

2.2 MJ 诱导下紫杉烷的浓度消长

组分 1~13 在 MJ 诱导前后的保留时间和相对含量 (RA) 见表 1 所示。

结果显示, MJ 诱导下, 所有紫杉烷含量都有所提高, 如果用诱导后这 13 个峰的面积分别与对照组比较, RA 范围在 1.2~32.1 倍。紫杉醇和 B - III 的浓度在诱导后是原来的 3 倍左右; Tc 和 C14 位衍生物等主要成分虽获得了可观的产量 (即按线性关系 $Y = 16453X - 40036.8$, 推算诱导后 Tc 的含量达到细胞干重的 0.2%), 但它的含量仅是对照组的 1.2~2.1 倍, 与其他成分相比含量增加并不显著。尽管这些浓度涨幅是用峰面积比值来表示的, 与 Menhard 等 (1998) 的绝对质量获得的相应的紫杉烷浓度变化基本一致, 说明 RA 较好地反映了诱导前后目的物的浓度的真实变化。诱导后浓度增加最高的是组分 6 和 7; 其次是 2 和 8。

表 1 细胞样中紫杉烷的 LC-MS 分析结果及 MJ 诱导前后相对含量比较

Table 1 The LC-MS analysis results and quantitative comparisons of taxanes of cell culture extracts in <i>Taxus chinensis</i>						
Peak I.D .	t_R (min)	MW	Assignment of LC peak	Relative Amount (RA)		
				CK	MJ inducement	Changes (%)
1 *	5.54	568	DAB - I	0.419	1.050	251
2	6.97	534	taxuspine F	0.101	1.247	1234
3 *	8.51	586	B - III	0.134	0.335	250
4	9.89	834	△型紫杉烷结构; 含 4 个乙酰基, 1 个苯甲酰基和 1 个六碳糖取代基	0.336	0.992	295
5	10.58	836	△型紫杉烷结构; 含 4 个乙酰基, 1 个苯甲酰基和 1 个六碳糖取代基	0.050	0.064	129
6	11.51	672	taxchinin M 或异构体	0.044	1.422	3230
7	12.36	674	taxchinin M 结构类似物	0.067	1.852	2760
8 *	13.24	652	B - VI	0.174	1.356	780
9 *	16.92	853	taxol	0.051	0.178	349
10	18.12	562	yunnanxane	5.939	8.314	140
11	19.81	504	Tc	17.39	36.53	210
12	23.23	518	sinenxane B	0.496	0.595	120
13	27.90	546	sinenxane C	0.294	0.412	140

注: “*” 为有对照品的组分; “△” 是指具有 11 (15→1) 重排骨架, 并且含有 C4 (20) 开环紫杉烷母核的结构; 相对含量以 10 μg ml 紫杉醇标准品峰面积响应值 75001 为参照、样品中各组分峰面积的比值表示; MJ 诱导后与之前的相对峰面积比值用以变化幅度。

3 讨论

红豆杉细胞中紫杉醇的主要合成途径已基本清楚 (Jennewein and Croteau, 2001), 从牛儿醇 牛儿醇焦磷酸 (GGPP) 到紫杉醇的生成, 先经过环化生成紫杉二烯, 再经过一系列的官能团修饰, 至少 15 步反应之后才生成紫杉醇, 途中有多个羟化和酰化步骤, 产生了无数个分支, 从而导致结构多样的紫杉烷类化合物的生成 (图 3), 可见, 通往紫杉醇生成方向的仅是这复杂代谢网络中的一部分流向。通过细胞培养过程中紫杉烷的代谢轮廓及其对 MJ 诱导响应的分析, 有助于认识紫杉醇的合成代谢流向及其影响因素。本实验研究中, MJ 诱导后所有检测的紫杉烷浓度都增加 (表 1), 这是因为 MJ 可以从转录水平上对 GGPP 合成酶起上调作用 (Walker and Croteau, 2001; Laskaris 等, 1999), 但由于 GG-PP 是紫杉烷类也是二萜类共同的前体, 因此, 它的激活并不可能引起各种紫杉烷浓度的差异。实验显示, MJ 诱导后的各种紫杉烷量的变化差异很大 (表 1), 说明 MJ 在官能团化阶段对代谢流向的影响是多位点的。

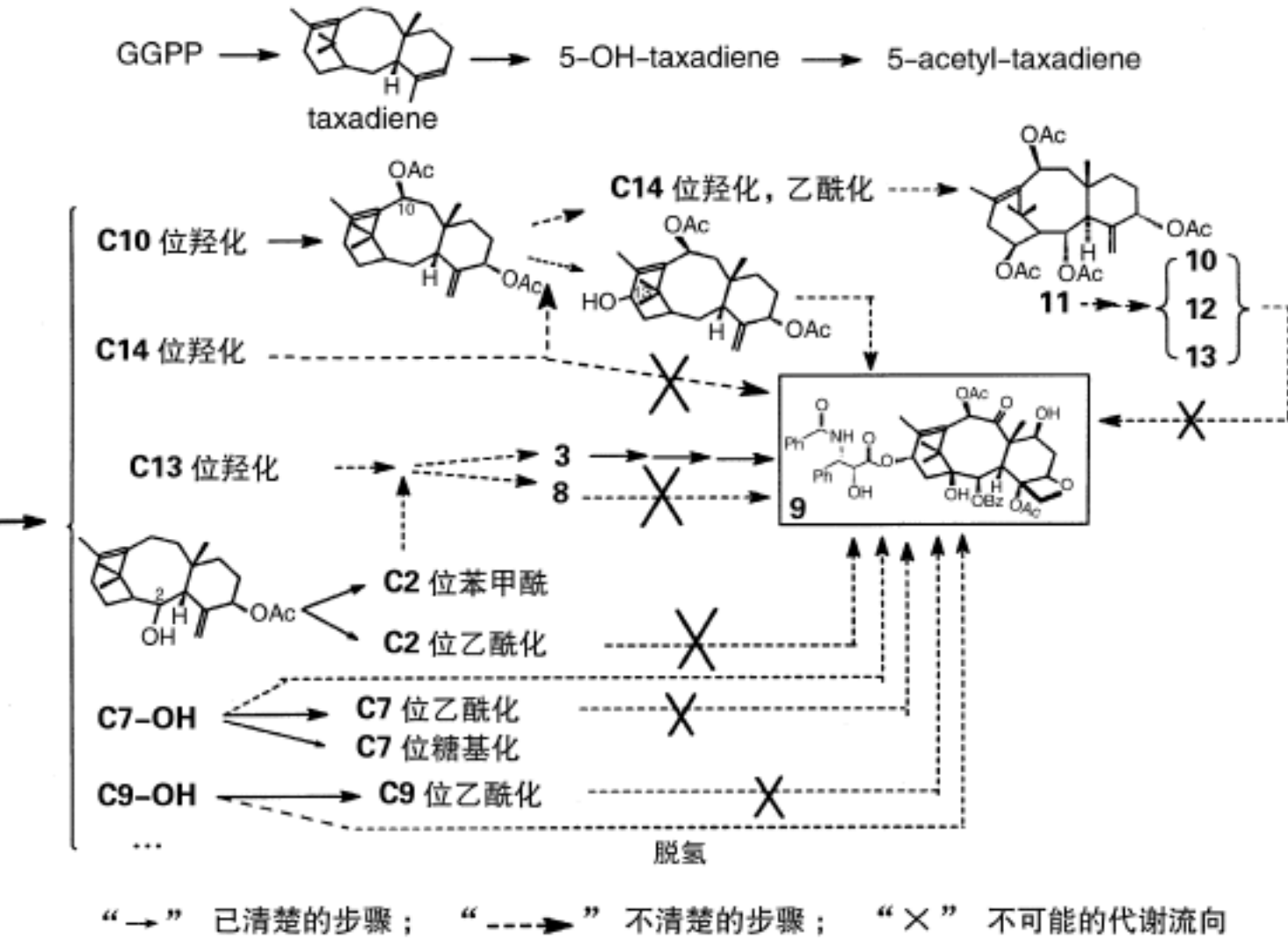


图 3 紫杉醇生物合成途径和主要代谢分支点示意图

Fig . 3 The sketch of pathway and principal metabolic diverseters of taxol biosynthesis

组分 10~13 是一组含有 C14 位乙酰取代的化合物 Tc 及其衍生物，在紫杉醇生物合成的研究中，Tc 常被作为模式中间体而受到了一定的关注（Eisenreich 等，1996；Chau and Croteau，2004）。本实验所用细胞株在未诱导时组分 10~13 含量就很高，与文献报道的 *T. chinensis*、*T. yunnanensis*、*T. cuspidate* 各种细胞株所产紫杉烷的轮廓比较接近（Baloglu and Kingstone，1999；Menhard 等，1998；Shigemori and Kobayashi，2004）。例如，Menhard 等（1998）的研究中，获得的紫杉烷 98% 以上是本实验的组分 10~13，如果用本实验对照组的这些组分（10~13）的峰面积总和比总检出紫杉烷峰面积，约等于 94%，与文献的结果基本吻合，说明 C14 位取代的紫杉烷代谢流向控制对提高紫杉醇产量很重要。从代谢流向看，Tc 及其衍生物（10~13）不是紫杉醇、B - III 等 C13 取代产物的生物合成前体，而是另一条分支途径的终端产物（图 3），因此，羟化发生在 C13 位还是 C14 位是决定后续产物紫杉醇组和 Tc 组含量的关键之一。已知所有羟氧化是由细胞色素 P450 单加氧家族酶催化的，包括 C13 位和 C14 位羟化酶（Jennewein and Croteau，2001；Jennewein 等，2003），在其它植物的研究中发现，MJ 能够提高细胞色素 P450 酶的活性，所以促进萜类次生代谢的合成。本实验 MJ 诱导后 Tc 组化合物浓度提高不如组分 3，8 和 9 等 C13 取代的几个化合物（表 1），说明 MJ 的诱导更有利于紫杉醇组的积累。

组分 6 和 7 是我们用质谱分析推测出的 11（15→1）重排型紫杉烷，该类紫杉烷在中

国红豆杉、云南红豆杉等亚洲种红豆杉产物中报道的比较多 (Baloglu and Kingston, 1999), 本实验结果显示, 组分 6 和 7 在 MJ 诱导后出现最显著的增量, 但同样具有重排结构的糖基化的组分 4 和 5, 相比之下浓度升高的幅度远不如组分 6 和 7, 提示后两者可能是组分 4 和 5 糖基水解后的产物。因此, MJ 对组分 4 和 5 糖基化的水解可能有促进作用。

乙酰化作用是羟化之后紫杉烷母核中另一个重要的官能团修饰步骤。因为紫杉醇的分子结构中, 仅 C4 和 C10 位含有乙酰基团, C4 位乙酰基是在 D 环形成时由 C5 位乙酰基转移而来 (Chau 等, 2004), 其它位置的乙酰取代 (如 C2、C7、C9、C13、C14 等) 对紫杉醇的生成是没有贡献的, 称之为非有效乙酰化。然而无论是在植株中还是在细胞培养物中, 现已分离到含非有效乙酰基团的产物远比紫杉醇的数量要多得多 (Baloglu and Kingston, 1999; Li, 2001; 余龙江和兰文智, 2002; Laskaris 等, 1999)。本实验用 LC-MS 方法分析可以确定, 受试细胞株中组分 1, 8, 10~13 的分子中都含有多个非有效乙酰取代基, 再根据多级质谱的数据, 可以推测 2 和 4~7 的分子中含有至少 3 个以上的乙酰取代基。这些与报道的 *Taxus baccata*、*T. brevifolia* 中紫杉烷的成分有一定的差别, 而与 *T. chinensis*、*T. yunnanensis*、*T. cuspidate* 等细胞株所产的紫杉烷的背景比较接近 (Baloglu and Kingston, 1999; Shigemori and Kobayashi, 2004; Menhard 等, 1998)。因此, 非有效乙酰化流向较强是本细胞株产紫杉烷的另一个重要特征。添加 MJ 后, 紫杉醇 (9) 和 B-III (3) 含量虽有提高, 但并不是细胞样检测到的紫杉烷中提高最显著的 (表 1), 至少说明 MJ 的添加并不能有效的逆转这种非有效乙酰化流向。我们研究小组最近用 PCR 的方法定量检测 10 - 乙酰转移酶的基因表达, 发现用 MJ 诱导后, 其表达水平比对照组提高 10^4 个数量级, 证实乙酰化酶是 MJ 强诱导型 (刘智等, 2005), 而 MJ 无论对紫杉醇有效的还是非有效的乙酰化酶, 其诱导效应并无太大的差异 (Chau and Croteau, 2004), 提示只有以对应的羟化和乙酰化基因作为靶点实施调控, 才可能带来紫杉醇代谢流的高通量定向流动。

参 考 文 献

- Baloglu E, Kingston DGI, 1999. The taxane diterpenoids [J]. *J Nat Prod*, 62: 1448—1472
- Brincat MC, Gibson DM, Shuler ML, 2002. Alterations in taxol production in plant cell culture via manipulation of the phenylalanine ammonia lyase pathway [J]. *Biotechnol Prog*, 18: 1149—1156
- Chau MyD, Walker K, Long R, et al, 2004. Regioselectivity of taxoid-O-acetyltransferases: heterologous expression and characterization of a new taxadien-5a-ol-O-acetyltransferase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 430: 237—246
- Chau MD, Croteau R, 2004. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2a-hydroxylase involved in Taxol biosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 427: 48—57
- Eisenreich W, Menhard B, Hylands PJ, et al, 1996. Studies on the biosynthesis of taxol; The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 6431—6436
- Fiehn O, 2002. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes [J]. *Plant Mol Biol*, 48: 155—168
- Fiehn O, Kopka J, Dormann P, et al, 2000. Metabolic profiling for plant functional genomics [J]. *Nat Biotechnol*, 18: 1157—1161
- Jennewein S, Croteau R, 2001. Taxol: biosynthesis, molecular, genetics, and biotechnological application [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57 (1 - 2): 9—13
- Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, et al, 2003. Taxoid metabolism: taxoid 14b-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent

- monooxygenase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 413: 262—270
- Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, *et al*, 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate [J]. *Biotechnol Bioeng*, 62 (1): 97—105
- Ketchum REB, Rithner CD, Qiu D, *et al*, 2003. *Taxus* metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus* x media cell cultures [J]. *Phytochemistry*, 62: 901—909
- Laskaris G, Bounkhay M, Theodoridis G, *et al*, 1999. Induction of geranylgeranyl diphosphate synthase activity and taxane accumulation in *Taxus baccata* cell cultures after elicitation by methyl jasmonate [J]. *Plant Science*, 147: 1—8
- Li SH, Zhang HJ, Yao P, *et al*, 2001. Taxane diterpenoids from the bark of *Taxus yunnanensis* [J]. *Phytochemistry*, 58: 369—374
- Liu Z (刘智), Yu LJ (余龙江), Zhao CF (赵春芳), *et al*, 2005. Development or inducement, who regulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报)
- Menhard B, Eisenreich W, Hylands PJ, *et al*, 1998. Taxoids from cell cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Phytochemistry*, 39: 113—125
- Morant M, Bak S, Moller BL, *et al*, 2003. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 14: 151—162
- Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, *et al*, 1994. Total synthesis of taxol [J]. *Nature*, 367: 630—632
- Shigemori H, Kobayashi J, 2004. Biological activity and chemistry of taxoids from the Japanese Yew, *Taxus cuspidata* [J]. *J Nat Prod*, 67: 245—256
- Walker K, Croteau R, 2001. Molecules of interest: taxol biosynthetic genes [J]. *Phytochemistry*, 58: 1—7
- Weckwerth W, Fiehn O, 2002. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 156—160
- Yu LJ, Lan WZ, Qin WM, *et al*, 2001. Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Process Biochemistry*, 37: 477—482
- Yu LJ (余龙江), Zhao CF (赵春芳), 2003. Advance in the secondary metabolic engineering of the production for taxol and taxanes [J]. *High Technology Letters* (高技术通讯), 13 (1): 106—110
- Yu LJ (余龙江), Lan WZ (兰文智), 2002. Separation, purification and identification of taxanenes in extract of *Taxus chinensis* leaves [J]. *Chemistry & Industry of Forest Products* (林产化学与工业), 22 (2): 45—48
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, *et al*, 1996. Methyljasmonate induced over production of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Nat Biotechnol*, 14: 1129—1132
- Zhang CH, Mei XG, Liu L, *et al*, 2000. Initiation, growth and taxol production of *Taxus chinensis* embryo-derived cell line [J]. *J Huazhong Univ Sci Tech*, 28: 60—63
- Zhao CF (赵春芳), Yu LJ (余龙江), 2005. LC-ESI-MS metabolic profiling analysis of taxanes from extracts of *Taxus chinensis* cell cultures [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 40 (8): 734—739